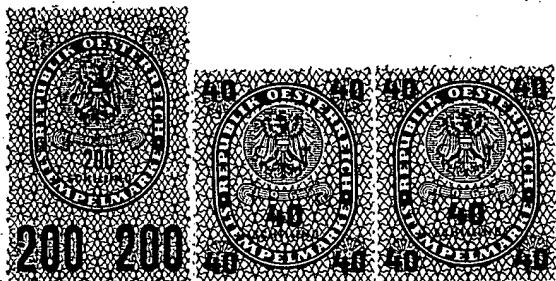


118' 29

24.330



ÖSTERREICHISCHES PATENTAMT  
WIEN I, KOHLMARKT 8-10



Aktenzeichen A 1189/79

Vom Österreichischen Patentamt wird hiemit bestätigt, daß  
die Firma IMMUNO Aktiengesellschaft für chemisch-medizinische  
Produkte in W i e n XXII., Industriestraße 72,  
am 15. Feber 1979 um 23 Uhr 59 Minuten eine  
Patentanmeldung, betreffend

" G e w e b e k l e b s t o f f " ,

überreicht hat und daß die beigeheftete Beschreibung ~~xxxx Zeich~~  
~~xxxx~~ mit der ursprünglichen, zugleich mit dieser Patentanmeldung  
überreichten Beschreibung ~~xxxx Zeichnung~~ vollkommen übereinstimmt.

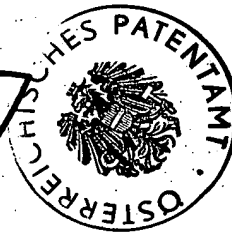
Österreichisches Patentamt

Wien, am 3. Jänner 1980

Der Präsident:

i.A.

Kanzleirat WITTMANN  
Fachoberinspektor



A 1189 / 79 - 1

Klasse:

Int. Cl.:

Urtext  
® Nr. 47

# AT PATENTSCHRIFT

⑦③ Patentinhaber:

IMMUNO Aktiengesellschaft für  
chemisch-medizinische Produkte  
in Wien

⑤④ Gegenstand:

Gewebeklebstoff

⑥① Zusatz zu Patent Nr.

⑥② Ausscheidung aus:

②②① Angemeldet am:

1978-02-15

②③ Ausstellungspriorität:

③③③②③① Unionspriorität:

④② Beginn der Patentdauer:

Längste mögliche Dauer:

④⑤ Ausgegeben am:

⑦② Erfinder:

⑥⑥ Abhängigkeit:

⑤⑥ Druckschriften, die zur Abgrenzung vom Stand der Technik in Betracht gezogen wurden:

## Gewebeklebstoff

Die Erfindung betrifft einen Gewebeklebstoff auf Basis von menschlichen oder tierischen Proteinen, enthaltend Fibrinogen und Faktor XIII.

- 5 Es ist seit langem bekannt, Blutgerinnungssubstanzen zur Stillung von Blutungen bzw. für Wundversiegelungen heranzuziehen. Nach den ersten derartigen Vorschlägen wurden Fibrintampons bzw. Fibrinplättchen verwendet. Während des Ersten Weltkrieges wurden Gewebeklebung mit Hilfe von  
10 Blutplasma vorgeschlagen.

- In letzter Zeit wurde von H. Matras u.a. in der "Wiener Medizinischen Wochenschrift", 1972, Seite 517, ein Gewebeklebstoff auf Basis von Fibrinogen und Faktor XIII  
15 zur nahtlosen interfazikulären Nerventransplantation im Tierexperiment beschrieben.

- Eine weitere Studie stammt von Spängler u.a. in der "Wiener Klinischen Wochenschrift", 1973, Seiten 1 bis 7. Auch  
20 hier wurde in Tierversuchen die Möglichkeit aufgezeigt, mit Hilfe von Fibrinogen als Kryopräzipitat und Thrombin eine Gewebeklebung vorzunehmen.

Die bekannten Präparate haben sich noch nicht als zu-

05874

friedenstellend erwiesen, weil sie die an einen Gewebeklebstoff zu stellenden Forderungen, welche die folgenden sind:

- 5 a) hohe Belastbarkeit der Klebungen bzw. Wundversiegelungen sowie sichere und anhaltende Blutstillung, d.h. gute Haftfähigkeit des Klebers an den Wund- bzw. Gewebsflächen, sowie hohe innere Festigkeit desselben,
  - b) regelbare Haltbarkeit der Klebungen im Körper
  - 10 c) vollkommene Resorbierbarkeit des Klebstoffes im Verlauf des Wundheilungsprozesses
  - d) wundheilungsfördernde Eigenschaften,
- noch nicht in ausreichendem Maße erfüllen. Dies mag teilweise darauf zurückzuführen sein, daß die für die Blutstillung notwendigen Gerinnungsfaktoren in den bekannten
- 15 Präparaten nicht in einem optimalen Verhältnis zueinander vorhanden waren und auch daran, daß die fibrinolytische Aktivität im Klebebereich nur ungenügend beherrscht wurde. Es kam häufig durch enzymatische Einwirkung zu einer vorzeitigen Auflösung der Gewebeklebung.

20

Die Erfindung bezweckt die Vermeidung dieser Nachteile und Schwierigkeiten und stellt sich die Aufgabe, einen lyophilisierten Gewebeklebstoff menschlichen oder tierischen Ursprungs zu schaffen, der die eingangs aufgestellten Voraussetzungen erfüllt und in lyophilisierter Form vorliegt, wonach wegen der längeren Haltbarkeit und

25 besseren Transport- bzw. Lagerfähigkeit ein Bedürfnis besteht.

30 Dementsprechend besteht die Erfindung in der Kombination der folgenden Merkmale:

- a) daß er mindestens 33 Gew.% Fibrinogen enthält,
- b) daß das Verhältnis des Faktors XIII zu Fibrinogen, ausgedrückt in Einheiten des Faktors XIII pro Gramm Fibrinogen, mindestens 80 beträgt,
- 35 c) daß im Gesamtprotein Fibrinogen und Albumin in ei-

.. ..- ..- .  
nem Verhältnis von 33 bis 90 : 5 bis 40 enthalten sind,

d) daß er einen Gehalt an Plasminogen-Aktivator-Inhibitor oder Plasmin-Inhibitor, vorzugsweise Aprotinin, in  
5 einer Menge von 250 bis 25.000 KIE pro g Fibrinogen enthält,

e) daß das Präparat lyophilisiert ist.

Nach einer bevorzugten Ausführungsform enthält der Gewebeklebstoff zusätzlich Glycin, wodurch die Wiederauflösbarkeit des lyophilisierten Produktes verbessert wird.  
10

Weiters kann der Gewebeklebstoff zusätzlich Glucose oder Saccharose enthalten, welche Komponenten ebenfalls die  
15 Auflösbarkeit fördern.

Der Gewebeklebstoff kann weiters 0,2 bis 200 IE Heparin pro g Fibrinogen enthalten, wodurch eine stabilisierende Wirkung erreicht wird.  
20

Der Gewebeklebstoff gemäß der Erfindung besitzt charakteristische Vernetzbarkeitseigenschaften nach der Auflösung, welche nach der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese-Methode bestimmbar sind. Der Test wird derart durchgeführt, daß nach dem Vermischen des Gewebeklebstoffes mit dem gleichen Volumen einer Lösung, enthaltend 40  $\mu$ Mol  $\text{CaCl}_2$  und 15 NIH-Einheiten (US International Institute of Health-Einheiten) Thrombin pro ml, die Mischung bei 37°C inkubiert wird. Der Vernetzungsgrad wird nach Stoppen  
25 der Reaktion und reduktiver Spaltung der in den Proteinen enthaltenen Disulfidbrücken durch Zugabe eines Gemisches von Harnstoff, Natriumdodecylsulfat und  $\beta$ -Mercaoptoöthanol durch Gelelektrophorese bestimmt. Charakteristisch für den erfindungsgemäßen Gewebeklebstoff ist eine voll-  
30 ständige Vernetzung der Fibrin- $\gamma$ -Ketten nach 3 bis 5 Minuten und eine mindestens 35 %ige Vernetzung der Fibrin- $\alpha$ -  
35

Ketten nach 2 Stunden.

Fibrinogen, Albumin und kälteunlösliches Globulin im Gesamtprotein sollen im erfindungsgemäßen Gewebeklebstoff  
5 in einem bestimmten Verhältnis stehen; dieses Verhältnis beträgt 33 bis 90 : 5 bis 40 : 0,2 bis 15.

Die Erfindung umfaßt des weiteren ein Verfahren zur Herstellung des beschriebenen Gewebeklebstoffes, ausgehend  
10 von Plasmakryopräzipitat, welches dadurch gekennzeichnet ist, daß aus dem Kryopräzipitat durch ein- oder mehrfache Behandlung mit einer Pufferlösung, welche Natriumcitrat, Natriumchlorid, Glycin, Glucose und einen Plasminogen-Aktivator-Inhibitor oder Plasmin-Inhibitor und Heparin  
15 enthält, kältelösliches Plasmaprotein entfernt, der gereinigte Niederschlag gelöst, Humanalbumin zugesetzt und die Lösung lyophilisiert wird.

Vorteilhaft wird das Kryopräzipitat aus humanem oder  
20 tierischem Frischplasma hergestellt, welches bei  $-20^{\circ}\text{C}$  eingefroren wurde. Bei Erhöhung der Temperatur auf 0 bis  $2^{\circ}\text{C}$  wird das Kryopräzipitat gewonnen und durch Zentrifugieren abgetrennt. Der Niederschlag wird durch ein- oder mehrmalige Elution mit der Pufferlösung, die einen  
25 pH-Wert von 6 bis 8,0 aufweist, eluiert und bei 0 bis  $4^{\circ}\text{C}$  zentrifugiert, um das kältelösliche Plasmaprotein zu entfernen. Die Behandlung mit der Pufferlösung wird bis zum Erreichen des gewünschten Faktor XIII - Fibrinogen - Verhältnisses durchgeführt.

30 Der gereinigte Niederschlag wird mit einer weiteren Pufferlösung, die Humanalbumin, Glycin und gegebenenfalls Glucose oder Saccharose sowie den Plasminogen-Aktivator-Inhibitor oder Plasmin-Inhibitor sowie Heparin enthält  
35 und einen pH-Wert von 6,5 bis 9,0 aufweist, gewaschen und auf eine Proteinkonzentration von 4,0 bis 9,0 % verdünnt. Die Lösung wird bis zu einer Porengröße von 0,2  $\mu$

filtriert, in die Endbehälter abgefüllt und lyophilisiert.

Der so erhaltene lyophilisierte Gewebekleber kann bei  
5 Zimmertemperatur oder vorzugsweise bei +4°C gelagert  
werden; er ist nach Rekonstitution mit Aqua ad iniectabilia, dem wahlweise ein Plasminogen-Aktivator-Inhibitor oder Plasmin-Inhibitor, vorzugsweise Aprotinin, beige-  
fügt werden kann, gebrauchsfertig. Bei der Auflösung  
10 des lyophilisierten Präparates ist darauf zu achten, daß  
die gebrauchsfertige Lösung mindestens 70 mg Fibrinogen  
pro ml enthält.

Der Gewebeklebstoff gemäß der Erfindung weist eine uni-  
15 verselle Anwendbarkeit auf. Er kann zum nahtlosen Ver-  
binden von menschlichen oder tierischen Gewebe- oder  
Organteilen, zur Wundversiegelung und Blutstillung sowie  
zur Förderung von Wundheilungen verwendet werden.

20 Bevorzugte Anwendungsgebiete für den erfindungsgemäßen  
Gewebeklebstoff, auf welchen der erfindungsgemäße Gewebe-  
klebstoff erfolgreich angewendet werden kann, sind:  
Indikationen im Bereich der Hals-, Nasen-, Ohren- und  
Kieferchirurgie, Zahnheilkunde, Neurochirurgie, plastischen  
25 Chirurgie, allgemeinen Chirurgie, Abdominalchirurgie,  
Thorax- und Gefäßchirurgie, Orthopädie, Unfallchirurgie,  
Urologie, Ophthalmologie und Gynäkologie.

Vorteilhaft wird vor der Applikation des erfindungsgemäßen Gewebeklebstoffes auf das zu verbindende Gewebe  
30 eine Mischung von Thrombin und Calciumchlorid dem Kleb-  
stoff zugefügt oder auf das Gewebe aufgebracht.

Das erfindungsgemäße Verfahren wird durch das folgende  
35 Beispiel näher erläutert:

005374

21 l humanes, bei  $-20^{\circ}\text{C}$  eingefrorenes Frischplasma wurden auf  $+2^{\circ}\text{C}$  erwärmt. Das entstandene Kryopräzipitat (435 g) wurde bei  $+2^{\circ}\text{C}$  durch Zentrifugieren abgetrennt und bei  $+2^{\circ}\text{C}$  mit 4,3 l einer Pufferlösung vom pH-Wert 6,5, die  
5 6,6 g  $\text{Na}_3\text{-Citrat}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 3,4 g  $\text{NaCl}$ , 10,0 g Glycin, 13,0 g  $\text{Glucose}\cdot 1\text{H}_2\text{O}$ , 50.000 KIE Aprotinin und 200 IE Heparin pro l enthielt, behandelt und nochmals bei  $+2^{\circ}\text{C}$  zentrifugiert. Der abgetrennte Niederschlag wurde in einer weiteren Pufferlösung vom pH-Wert 7,9, welche 35,0 g Humanalbumin,  
10 20,0 g Glycin, 50.000 KIE Aprotinin und 200 IE Heparin pro l enthielt, gelöst und auf eine Konzentration von 70 mg Protein pro ml verdünnt.

Sodann wurde die Lösung über Membranfilter bis zu einer  
15 Porengröße von  $0,2\ \mu$  sterilfiltriert, zu je 2,2 ml in Endbehälter abgefüllt, tiefgefroren und lyophilisiert. Nach Rekonstitution des lyophilisierten Produktes auf eine Fibrinogenkonzentration von 90 mg/ml zeigte das gebrauchsfertige Gewebeklebstoffpräparat im Vernetzungstest eine  
20 vollständige Fibrin- $\gamma$ -Vernetzung nach 5 Minuten und eine 66 %ige Fibrin- $\alpha$ -Vernetzung nach 2 Stunden bei  $37^{\circ}\text{C}$ .

Das Verhältnis der im Gewebeklebstoff enthaltenen Proteine Fibrinogen zu Albumin zu kälteunlöslichem Globulin wurde  
25 mit 64,0 : 22,3 : 7,7 festgestellt. Der Hepariningehalt betrug 4,5 IE pro g Fibrinogen. Aprotinin war in einer Konzentration von 1133 KIE pro g Fibrinogen enthalten. Der Gehalt an Faktor XIII war 161 Einheiten pro g Fibrinogen. Der Gehalt an Gesamtprotein im lyophilisierten Präparat  
30 betrug 72,2 %, der Gehalt an Fibrinogen im lyophilisierten Präparat 46,2 %.

Die Bestimmungen erfolgten in folgender Weise: Die Bestimmung der Faktor XIII-Einheiten erfolgte mittels eines Vernetzungstests, bei dem Faktor XIII-freies Fibrinogen als Substrat verwendet und die durch die Zugabe der  
35

unbekannten verdünnten Probe bewirkte Fibrinvernetzung  
als Maß für den darin enthaltenen Faktor XIII-Gehalt  
diente. Eine entsprechende Eichkurve wurde mit gepooltem  
humanem Citratplasma erhalten, wobei per definitionem  
5 1 ml Plasma 1 Einheit Faktor XIII enthält. Die quanti-  
tativen Proteinbestimmungen erfolgten mittels der Methode  
nach Kjeldahl.

Die Bestimmung der Proteine relativ zueinander erfolgte  
10 ebenfalls mit der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese-  
Methode, u.zw. a) einer nicht reduzierten und b) einer  
mit  $\beta$ -Mercaptoäthanol reduzierten Probe des Gewebeklebers.

000004

# Patentansprüche:

1. Gewebeklebstoff auf Basis von menschlichen oder tierischen Proteinen, enthaltend Fibrinogen und Faktor XIII, gekennzeichnet durch die Kombination der folgenden Merkmale:
  - a) daß er mindestens 33 Gew.% Fibrinogen enthält,
  - b) daß das Verhältnis des Faktors XIII zu Fibrinogen, ausgedrückt in Einheiten des Faktors XIII pro Gramm Fibrinogen, mindestens 80 beträgt,
  - c) daß im Gesamtprotein Fibrinogen und Albumin in einem Verhältnis von 33 bis 90 : 5 bis 40 enthalten sind,
  - d) daß er einen Gehalt an Plasminogen-Aktivator-Inhibitor oder Plasmin-Inhibitor, vorzugsweise Aprotinin, in einer Menge von 250 bis 25.000 KIE pro g Fibrinogen enthält,
  - e) daß das Präparat lyophilisiert ist.
2. Gewebeklebstoff nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß er zusätzlich Glycin enthält.
3. Gewebeklebstoff nach den Ansprüchen 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß er zusätzlich Glucose oder Saccharose enthält.
4. Gewebeklebstoff nach den Ansprüchen 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß er 0,2 bis 200 IE Heparin pro g Fibrinogen enthält.
5. Gewebeklebstoff nach den Ansprüchen 1 bis 4, gekennzeichnet durch eine vollständige Vernetzbarkeit der Fibrin- $\gamma$ -Ketten durch Inkubation nach 3 bis 5 Minuten und eine mindestens 35 %ige Vernetzbarkeit der Fibrin- $\alpha$ -Ketten nach zweistündiger Inkubation, bestimmt nach der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese-Methode, nach Auflösung des lyophilisierten Präparates.

6. Gewebeklebstoff nach den Ansprüchen 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß das Verhältnis von Fibrinogen zu Albumin zu kälteunlöslichem Globulin im Gesamtprotein 33 bis 90 : 5 bis 40 : 0,2 bis 15 beträgt.

5

7. Verfahren zur Herstellung eines Gewebeklebstoffes nach den Ansprüchen 1 bis 6 aus Plasmakryopräzipitat, dadurch gekennzeichnet, daß aus dem Kryopräzipitat durch ein- oder mehrfache Behandlung mit einer Pufferlösung, welche Natriumcitrat, Natriumchlorid, Glycin, Glucose und einen Plasminogen-Aktivator-Inhibitor oder Plasmin-Inhibitor und Heparin enthält, kältelösliches Plasmaprotein entfernt, der gereinigte Niederschlag gelöst, Humanalbumin zugesetzt und die Lösung lyophilisiert wird.

15

8. Anwendung des Gewebeklebstoffes nach den Ansprüchen 1 bis 7 zum nahtlosen Verbinden von menschlichen oder tierischen Gewebe- oder Organteilen, zur Wundversiegelung und Blutstillung sowie zur Förderung von Wundheilungen.

20

9. Anwendung des Gewebeklebstoffes nach Anspruch 8 mit der Maßgabe, daß vor seiner Applikation auf das zu verbindende Gewebe eine Mischung von Thrombin und Calciumchlorid dem Klebstoff zugefügt oder auf das Gewebe aufgebracht wird.

25

IMMUNO  
Aktiengesellschaft für chemisch-  
medizinische Produkte

durch:

Wien, den  
cm

1979-02-15